

IAP20 Rec'd PCT/PTO 22 DEC 2005

1

**Beschreibung**

KAPAZITIVES BIOSENSOR-ELEMENT UND VERFAHREN ZUM DETEKTIEREN VON HYBRIDISIERUNGS-EREIGNISSEN

5

Die Erfindung betrifft ein Sensor-Element, ein Sensor-Array und ein Verfahren zum Erfassen von in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln.

10 Aus dem Stand der Technik sind Impedanzsensoren für die Biosensorik bekannt, siehe [1] bis [8], deren Messprinzip auf der Veränderung der Impedanz einer Sonde in Gegenwart zu erfassender Partikel beruht.

15 Im Weiteren wird bezugnehmend auf **Fig.1** ein aus dem Stand der Technik bekannter DNA-Sensor beschrieben.

Bei dem in Fig.1 gezeigten Biosensor-Element 100 sind auf einem Substrat 101 eine erste Elektrode 102 aus Gold und eine  
20 zweite Elektrode 103 aus Gold gebildet. Die erste und zweite Elektrode 102, 103 sind als Interdigitalelektroden realisiert, d.h. als fingerförmig ineinandergreifende Elektrodenstrukturen. In Fig.1 ist eine Draufsicht des Biosensor-Elements 100 und eine Querschnittsansicht gezeigt,  
25 aufgenommen entlang einer Schnittlinie I-I'.

Im Weiteren wird bezugnehmend auf **Fig.2A**, **Fig.2B** die Funktionalität des Biosensor-Elements 100 anhand einer Betrachtung eines vergrößerten Teilbereichs 104 des  
30 Biosensor-Elements 100 näher beschrieben.

In Fig.2A, Fig.2B ist gezeigt, dass auf den Elektroden 102, 103 jeweils Fängermoleküle 200 immobilisiert sind. Die Fängermoleküle 200 sind DNA-Halbstränge. Als Material für die  
35 Elektroden 102, 103 wird häufig Gold verwendet, da in diesem Falle das Anbinden von Fängermolekülen 200 an die Gold-Elektroden 102, 103 mittels einer Bindung zwischen Thiol-

Endgruppen (SH) der Fängermoleküle 200 und dem Gold-Material der Elektroden 102, 103 aufgrund der chemisch günstigen Gold-Schwefel-Bindung gut realisierbar ist.

5 Zum Erfassen von in einem Analyten 201 möglicherweise  
enthaltenen Partikeln 203 wird ein solcher Analyt 201 mit dem  
Biosensor-Element 100 in Wirkkontakt gebracht. Im Falle des  
in diesem Beispiel beschriebenen DNA-Sensors sind die zu  
erfassenden in dem Analyten 201 möglicherweise enthaltenen  
10 Partikel 203 ebenfalls DNA-Halbstränge. Der Analyt 201 ist  
häufig eine elektrolytische Lösung, die auf das Vorhandensein  
zu erfassender Partikel 203 untersucht werden soll. Eine  
Hybridisierung zwischen Fängermolekülen 200 und zu  
erfassenden Partikeln 203 erfolgt nur dann, wenn  
15 Fängermoleküle 200 und zu erfassende Partikel 203 gemäß dem  
Schlüssel-Schloss-Prinzip zueinander passen (siehe Fig.2B).  
Als Hybridisierung wird eine Anbindung der DNA-Halbstränge an  
die Fängermoleküle 200 bezeichnet. Sind Fängermoleküle 200  
und zu erfassende Partikel 203 zueinander nicht komplementär,  
20 d.h. passen die Basensequenzen der DNA-Halbstränge 200, 203  
nicht zueinander, so erfolgt keine Hybridisierung (siehe  
Fig.2A). Die Spezifität des Biosensor-Elements 100 leitet  
sich somit aus der Spezifität der Fängermoleküle 200 zum  
Hybridisieren mit ganz speziellen zu erfassenden Partikeln  
25 203 ab.

Zum Erfassen der Partikel 203 wird als elektrischer Parameter  
bei dem Biosensor-Element 100 die Impedanz  $Z$  202 zwischen den  
Elektroden 102, 103 erfasst. Im Falle erfolgter  
30 Hybridisierung ändert sich der Wert der Impedanz, da  
Fängermoleküle 200 und zu erfassende Partikel 203 als DNA-  
Halbstränge jeweils relativ schlecht elektrisch leitfähig  
sind und nach der Hybridisierung das Volumen des relativ gut  
elektrisch leitfähigen elektrolytischen Analyten 201 aus dem  
35 die Elektroden 102, 103 umgebenen Volumen verdrängen. Eine  
Veränderung des Werts der Impedanz kann somit als  
Sensorereignis interpretiert werden.

In **Fig.3** ist nochmals ein Teil des Biosensor-Elements 100 mit seinem Teilbereich 104 gezeigt. In Fig.3 sind ferner Verläufe elektrischer Feldlinien 301 zwischen den

5 Interdigitalelektroden 102, 103 gezeigt, wenn an diese eine elektrische Spannung zum Betreiben des Biosensor-Elements 100 angelegt ist. In Fig.3 sind Umgebungsbereiche 300 der Elektroden 103, 102 eingezeichnet, in welchen sich nach

10 erfolgtem Hybridisierungsereignis die elektrischen Eigenschaften aufgrund der Anwesenheit relativ schlecht elektrisch leitfähiger zu erfassender Partikel 203 besonders stark ändern. Fig.3 ist ferner zu entnehmen, dass die

Verläufe der elektrischen Feldlinien 300 bei einer Interdigitalelektroden-Anordnung gemäß Fig.1 Symmetrielinien

15 302 aufweisen und sich periodisch wiederholen. Daher ist im Weiteren eine Betrachtung von nur zwei benachbarten Elektroden 102, 103 gerechtfertigt.

In **Fig.4A** ist für den Teilbereich 104 ein erstes

20 Ersatzschaltbild 400 gezeigt, in welchem die Komponenten des Biosensor-Elements 100 in Form schaltungstechnischer konzentrierter Komponenten modelliert sind. Aus

schaltungstechnischer Sicht enthält das Biosensor-Element 100 eine zweite Elektrode-Elektrolyt-Kapazität 401  $C_M$  zwischen

25 zweiter Elektrode 103 und dem elektrolytischen Analyten 201. Ferner ist, parallel geschaltet zu der zweiten Elektrode-Elektrolyt-Kapazität 401, ein zweiter Elektrode-Elektrolyt-

Widerstand 402  $R_M$  (ohmscher Widerstand) gezeigt. In Reihe zu den parallel geschalteten Komponenten 401, 402 sind die

30 parallelgeschalteten Komponenten Elektrolyt-Kapazität 403  $C_E$  und Elektrolyt-Widerstand 404  $R_E$  (ohmscher Widerstand),

mittels welcher die elektrischen Eigenschaften des elektrolytischen Analyten 201 modelliert werden, geschaltet. Die Parallelschaltung der Komponenten 403, 404 ist in Reihe

35 mit einer Parallelschaltung aus einer ersten Elektrode-Elektrolyt-Kapazität 405  $C_M$  und einem ersten Elektrode-Elektrolyt-Widerstand 406  $R_M$  (ohmscher Widerstand)

geschaltet. Bei einer theoretischen Beschreibung eines solchen Biosensor-Elements 100 wird häufig davon ausgegangen, dass sich in erster Linie nur die Werte der Komponenten  $C_M$  und  $R_M$  im Falle einer Hybridisierung ändern (Komponenten 401, 402, 405, 406, siehe Fig.4A).

Da sich jedoch nicht nur die Elektroden-Impedanzen aufgrund der hybridisierungsbedingten Änderungen der elektrischen Eigenschaften in unmittelbarer Nähe der Elektroden 103, 102 ändern, sondern auch die Eigenschaften eines grenzflächennahen Volumens der Elektroden 103, 102 (siehe Umgebungsbereiche 300 in Fig.3), kann zur noch genaueren Beschreibung des Biosensor-Elements 100 das zweite Ersatzschaltbild 410 aus Fig.4B verwendet werden. Bei dem zweiten Ersatzschaltbild 410 sind auch die den Elektrolyt 201 kennzeichnenden Elemente  $C_E$  und  $R_E$  als infolge einer Hybridisierung veränderliche Größen dargestellt.

Um bei dem Biosensor-Element 100 den Wert der Impedanz messtechnisch zu erfassen, wird zum Beispiel an eine der Elektroden 103, 102 mittels einer Wechselspannungsquelle 500 eine Wechselspannung  $V$  angelegt, wie in Fig.5A gezeigt. Ein Anschluss der Wechselspannungsquelle 500 und ein Anschluss der Komponenten 401, 402 ist auf das elektrische Massepotential 504 gebracht. Ferner wird ein aus der Wechselspannung an den Elektroden 103, 102 resultierendes Wechselstromsignal  $I$  mittels einer Stromerfasseinheit 501 ausgewertet. Alternativ kann auch an beide Elektroden 103, 102 jeweils ein Signal, d.h. eine elektrische Spannung, angelegt werden. In diesem Falle sind diese Signale dann gegenphasig zueinander.

In Fig.5B ist ein Szenario gezeigt, bei dem die Kapazitäten 401, 405 als identisch und bei dem die ohmschen Widerstände 402, 406 als identisch angenommen sind. In diesem Fall sind die Kapazitäten 401, 405 zu einer effektiven Elektrode-Elektrolyt-Kapazität 502 und sind die Komponenten 402, 406 zu

einem effektiven Elektrode-Elektrolyt-Widerstand 503 (ohmscher Widerstand) zusammengefasst.

In Fig.5A, Fig.5B sind die Komponenten  $C_E$  und  $R_E$  als nicht  
5 veränderliche elektrische Parameter dargestellt. Sofern deren Änderung infolge einer Hybridisierung miterfasst werden soll, ergeben sich die in Fig.5C bzw. Fig.5D gezeigten Darstellungen mit infolge einer Hybridisierung veränderlichen Komponenten 403, 404.

10

Ein in Fig.1 gezeigter Abstand  $d$  zwischen den Elektroden 102, 103 liegt typischerweise im Sub-Mikrometer-Bereich. Ein Biosensor-Element 100 kann (wie in Fig.1 gezeigt) im Wesentlichen rechteckig vorgesehen sein. In [2], [9] und [10]  
15 sind kreisförmige Anordnungen beschrieben, was aus Gründen der Fluidik günstig sein kann (für den Spotting-Prozess beim Aufbringen der Fängermoleküle auf die Elektroden 102, 103). Die äußeren Abmessungen  $l$  (siehe Fig.1) bzw. der Durchmesser eines Biosensor-Elements liegt typischerweise im Bereich  
20 zwischen weniger als 100 Mikrometern und einigen zehn Millimetern.

Für die anregende Wechselspannung  $V$  der Wechselspannungsquelle 500 gilt, dass diese einen  
25 Scheitelwert aufweisen sollte, der einen bestimmten Maximalwert nicht überschreiten sollte. Bei Überschreitung eines solchen Maximalwertes sind die biochemischen bzw. elektrochemischen Bedingungen nicht mehr erfüllt, welche für den Betrieb eines Biosensor-Elements 100 erforderlich sind.  
30 Übersteigt das Elektrodenpotential einen bestimmten Wert, so können bestimmte Stoffe an einer Elektrode oxidiert werden. Unterschreitet das elektrische Potential einen anderen Schwellwert, werden an der Elektrode Stoffe reduziert. Eine unerwünschte Oxidation bzw. Reduktion kann unter anderem dazu  
35 führen, dass die chemischen Bindungen, die bei der Immobilisierung und Hybridisierung eingegangen werden können, aufgebrochen werden. Ferner kann an den Sensor-Elektroden

102, 103 Elektrolyse einsetzen, wobei die Elektrolyseprodukte das für den Betrieb der Sensoren erforderliche chemische Milieu aus dem Gleichgewicht bringen. Die Absolutwerte der kritischen Potentiale resultieren aus der Zusammensetzung und den Konzentrationsverhältnissen der chemischen Umgebung der Elektroden (Immobilisierungsschicht, Analyt, etc.).

Typische Werte für die anregende Spannung liegen im Bereich einiger 10 mV bis in den Bereich um 100 mV. Die Größe des resultierenden Messsignals (z.B. elektrischer Strom) ist näherungsweise direkt proportional zu der angelegten Spannung.

Häufig ist man daran interessiert, nicht nur einen Test mit einem Sensor durchzuführen, sondern viele Tests an einer gegebenen Probe, dem Analyten 201, zeitlich parallel. Auf einem Chip realisierbare miniaturisierte Bio-/Chemosensor-Arrays dienen dem Parallelnachweis unterschiedlicher zu erfassender Partikel 203 in dem zu untersuchenden Analyten 201. Die Vielzahl elektrischer Sensor-Elemente ist in großer Zahl auf einem Chip aus Glas, Plastik, Silizium oder einem anderen Substrat-Material angeordnet. Es ergeben sich für derartige Sensor-Array-Chips einschließlich entsprechender Auswertesysteme vielfältige Anwendungen in der medizinischen Diagnosetechnik, in der Pharmaindustrie, z.B. für das Pharma-Screening ("High Throughput Screening", HTS), in der chemischen Industrie, in der Lebensmittelanalytik, in der Umwelt- und Lebensmitteltechnik und -analytik, etc.

Die beschriebenen, aus dem Stand der Technik bekannten Sensor-Elemente weisen häufig den Nachteil einer geringen Sensitivität im Bereich der Molekül- bzw. DNA-Sensorik auf. Dies wird anhand der Darstellung in Fig.6A, Fig.6B erklärt. Die laterale Ausdehnung  $d_{\text{strand}}$  der doppelsträngigen DNA nach der Hybridisierung (vgl. Fig.6B) ist zwar größer als die von einzelsträngiger DNA (vgl. Fig.6A), allerdings häufig klein gegen den Abstand  $d_{\text{footprint}}$  benachbarter Moleküle voneinander.

Daher sind die elektrischen Eigenschaften des betrachteten Volumens im Wesentlichen von den Eigenschaften des Elektrolyten 201 und nur in geringfügiger Weise von den Eigenschaften der Moleküle 200, 203 bestimmt. Die geringere Sensitivität bekannter Sensor-Elemente beruht ferner häufig darauf, dass die DNA-Moleküle unabhängig von der Tatsache, ob eine Hybridisierung stattgefunden hat oder nicht, von den zu der Leitfähigkeit des umgebenden Elektrolyten beitragenden Ionen durchsetzt sind.

Im Weiteren wird bezugnehmend auf **Fig.7A**, **Fig.7B** beschrieben, wie dieses Problem gemäß [4] verringert werden soll. In [4] wird vorgeschlagen, die Breite der Elektroden 102, 103 und die Abstände der Elektroden 102, 103 voneinander möglichst gering zu wählen (typischerweise 200 Nanometer und darunter, bis zu der Größenordnung der Moleküle 200, 203). In diesem Fall wird eine höhere Sensitivität erwartet, da die Dichte der Feldlinien 301, welche durch das relevante Volumen 300 verlaufen, in dem die Hybridisierung stattfindet, wesentlich größer ist, als im Falle größerer Elektrodenbreiten und -abstände. In Fig.7A ist ein Biosensor-Element mit relativ großem Elektrodenabstand und -breite gezeigt, bei dem in Fig.7B gezeigten Biosensor-Element sind Elektrodenabstand und -breite verringert.

Allerdings wird durch das Verringern der Elektrodenbreite und der Elektrodenabstände das Problem einer zu geringen Volumenbesetzung nur ungenügend gelöst. Ferner ist zu berücksichtigen, dass zwar Apparaturen für die Prozessierung sehr geringer Strukturbreiten von der modernen Mikroelektronik bereitgestellt sind, allerdings sind diese sehr teuer und für die Standard-Metalle (Kupfer, Aluminium, Wolfram) in der Mikroelektronik optimiert. Die Elektronenstrahl-Lithografie, welche die Erzeugung noch geringerer Strukturbreiten als mit den heute üblichen Standard-Lithografieverfahren erlaubt, gestattet lediglich eine sequenzielle Abarbeitung der geforderten Strukturen und

keine zeitlich parallele Prozessierung und ist somit aus Kostengründen ebenfalls ungeeignet.

Aus [11] ist bekannt, zu erfassende Partikel in einem  
5 Analyten mit kleinen Metallkügelchen als Label zu versehen.  
Derartige Metallkügelchen werden aus Materialien wie Gold  
oder Silber hergestellt und mit Durchmessern einiger  
Nanometer verwendet. Bei dem aus [11] bekannten Verfahren zum  
Detektieren von DNA-Halbsträngen werden Fängermoleküle an  
10 einem Oberflächenbereich zwischen zwei Elektroden  
immobilisiert. Moleküle der zu detektierenden Substanz werden  
mit den Gold-Labeln versehen. Dann wird die Probe mit dem  
Sensor-Element in Wirkkontakt gebracht. Nach einem erfolgten  
Hybridisierungsereignis sind in dem Bereich zwischen den  
15 Elektroden auch die elektrisch gut leitenden Metallkügelchen  
angeordnet. Gemäß [11] muss nach einem erfolgten  
Hybridisierungsereignis eine Silber-haltige Lösung mit den  
aufgrund der Hybridisierung generierten Doppelsträngen in  
Wirkkontakt gebracht wird, wodurch Zwischenbereiche zwischen  
20 benachbarten Metallkügelchen mit Silber-Material überbrückt  
werden, so dass eine elektrisch leitfähige Brücke zwischen  
den beiden Elektroden erzeugt wird. Dadurch wird der Wert des  
ohmschen Widerstands zwischen den beiden Elektroden deutlich  
geändert, welcher als Maß für das Hybridisierungsereignis  
25 messtechnisch detektiert wird.

Allerdings weist der aus [11] bekannte Sensor den Nachteil  
auf, dass das Herstellen einer elektrisch leitfähigen Brücke  
unter Verwendung von Metallkügelchen und der zusätzliche  
30 Verfahrensschritt des Überbrückens benachbarter Gold-Label  
mit Silber-Material aufwändig und technisch schwierig ist.

[12] offenbart eine Biochip-Anordnung mit einem Substrat, mit  
mindestens einem auf oder in dem Substrat angeordneten Sensor  
35 und mit einer elektrisch leitfähigen Permeationsschicht.



Der Erfindung liegt insbesondere das Problem zugrunde, ein Sensor-Element, ein Sensor-Array und ein Verfahren zum Erfassen von in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln bereitzustellen, bei denen es mit verringertem Aufwand möglich ist, zu erfassende Partikel mit hoher Nachweissensitivität zu erfassen.

Das Problem wird durch ein Sensor-Element, durch ein Sensor-Array und durch ein Verfahren zum Erfassen in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln mit den Merkmalen gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst.

Das erfindungsgemäße Sensor-Element zum Erfassen von in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln enthält ein Substrat, mindestens zwei Elektroden in und/oder auf dem Substrat und an einem Oberflächenbereich des Substrats immobilisierte Fängermoleküle. Diese sind derart eingerichtet, dass sie mit in einem Analyten möglicherweise enthaltenen zu erfassenden Partikel hybridisieren, welche Partikel ein Label aufweisen, das von dem Analyten unterschiedliche elektrische Eigenschaften aufweist. Ferner enthält das Sensor-Element eine mit den Elektroden gekoppelte Erfass-Einrichtung zum Erfassen einer Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz zwischen den Elektroden aufgrund infolge eines Hybridisierungsereignisses in einem Umgebungsbereich der Elektroden befindlicher Label.

Das erfindungsgemäße Sensor-Array enthält eine Mehrzahl von in und/oder auf dem Substrat gebildeten Sensor-Elementen mit den oben beschriebenen Merkmalen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Erfassen von in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln wird ein Sensor-Element mit den oben beschriebenen Merkmalen verwendet. Gemäß dem Verfahren wird der Analyt mit den an dem Oberflächenbereich des Substrats immobilisierten Fängermolekülen in Wirkkontakt gebracht derart, dass die

Fänger-moleküle mit in dem Analyten möglicherweise enthaltenen zu erfassenden Partikeln hybridisieren. Die Partikel weisen ein Label auf, das von dem Analyten unterschiedliche elektrische Eigenschaften aufweist. Ferner wird mittels der mit den Elektroden gekoppelten Erfass-Einrichtung eine Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz zwischen den Elektroden aufgrund infolge eines Hybridisierungsereignisses in einem Umgebungsbereich der Elektroden befindlicher Label erfasst.

Anschaulich kann eine Grundidee der Erfindung darin gesehen werden, dass bei dem erfindungsgemäßen Sensor-Element die Nachweissensitivität aufgrund der Verwendung von zu erfassenden Partikeln mit einem Label mit zu dem Analyten unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften verwendet wird, und dass die Detektion von Hybridisierungsereignissen mittels eines nicht ohmschen, z.B. kapazitiven Messverfahrens erfolgt. Bei Verwendung von ausreichend großvolumigen Labels an zu erfassenden Partikeln wird in Falle eines Hybridisierungsereignisses ein elektrolytischer Analyt aus dem Umgebungsbereich der Elektroden des Sensor-Elements verdrängt und durch ein Material mit einer deutlich unterschiedlichen elektrischen Eigenschaft ersetzt. Dadurch ändert sich der Imaginär-Anteil der Impedanz zwischen den Elektroden, insbesondere die Kapazität, in signifikanter Weise. Diese Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz wird messtechnisch erfasst.

Im Unterschied zu dem aus [11] bekannten Verfahren ist es erfindungsgemäß entbehrlich, dass eine durchgehende leitfähige Verbindung zwischen zwei Messelektroden aufgrund von Labeln an zu erfassenden Partikeln hergestellt wird. Dies beruht darauf, dass erfindungsgemäß im Unterschied zu [11] nicht der ohmsche Widerstand zwischen zwei Elektroden, sondern eine Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz erfasst wird. Das Ausbilden einer die Elektroden vollständig überbrückenden elektrisch leitfähigen Verbindung ist somit

erfindungsgemäß nicht Voraussetzung für das erfolgreiche Detektieren von Hybridisierungsereignissen, da nicht der ohmsche Widerstand, sondern der kapazitive Anteil der Impedanz erfasst wird.

5

Im Unterschied zu [11] ist es ferner erfindungsgemäß nicht zwingend erforderlich, dass die Elektroden dem elektrolytischen Analyten unmittelbar ausgesetzt sind.

Beispielsweise können aufgrund des kapazitiven Messverfahrens der Erfindung die Elektroden mit einer Passivierungsschicht bedeckt sein, so dass die Elektroden vor einer negativen Beeinflussung durch einen chemisch möglicherweise aggressiven Elektrolyten geschützt sind. Dadurch ist die Lebensdauer des erfindungsgemäßen Sensor-Elements erhöht. Ferner muss dabei kein spezielles Material für die Elektroden wie z.B. Gold verwendet werden, es können alle elektrisch leitfähigen Materialien verwendet werden, welche z.B. herstellungstechnisch günstiger und preiswerter in den Herstellungsprozess eingefügt werden können bzw. in diesem bereits zur Verfügung stehen. Im Unterschied zu der Erfindung muss gemäß [11] die Elektrode in jedem Fall in elektrischem Wirkkontakt mit dem Elektrolyten sein, da ein ohmscher Widerstand zwischen den Elektroden erfasst wird. Gemäß [11] muss ferner nach einem erfolgten Hybridisierungsereignis eine Silber-haltige Lösung mit den aufgrund der Hybridisierung generierten Doppelsträngen in Wirkkontakt gebracht wird, wodurch Zwischenbereiche zwischen benachbarten Metallkügelchen mit Silber-Material überbrückt werden, so dass eine elektrisch leitfähige Brücke zwischen den beiden Elektroden erzeugt wird. Dieser aufwendige Verfahrensschritt ist bei der erfindungsgemäßen Lösung entbehrlich.

35

Es ist anzumerken, dass die Label mit von dem Analyten unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften beispielsweise metallisch leitfähig oder schlecht elektrisch leitfähig sein können oder eine besonders große relative Dielektrizitätskonstante aufweisen können. Es ist lediglich

erforderlich, dass der kapazitive Anteil der Impedanz zwischen den Elektroden bei Anwesenheit der Label in einem Umgebungsbereich der Elektroden einer signifikanten Änderung unterworfen ist.

5

Ein Unterscheidungsmerkmal des erfindungsgemäßen Sensor-Elements bei Verwendung metallisch leitfähiger Label zu bekannten Sensor-Elementen besteht darin, das im Falle einer erfolgreichen Hybridisierung der Komplex-Widerstand zwischen  
10 den Elektroden abnimmt, bzw., wenn nur die kapazitive Komponente bedacht wird, der Wert der Kapazität zunimmt, und nicht deren Impedanz zu- bzw. der Wert der kapazitiven Komponenten abnimmt.

15

Aufgrund des Einbringens der Label mit den zu dem Analyten unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften wird im Falle eines metallischen Labels aus einem elektrisch gut leitenden Material der Verlauf der Feldlinien insbesondere in einem Umgebungsbereich der Elektroden massiv beeinflusst. Mit  
20 anderen Worten ist der Messeffekt sehr groß. Anstelle elektrisch sehr gut leitender Labels oder Beads als Labelmoleküle können auch solche Beads verwendet werden, die zwar einem ähnlichen Durchmesser wie die zuvor beschriebenen gut leitenden Beads haben, jedoch eine andere elektrische  
25 Eigenschaft. Sofern der elektrische Widerstand solcher Beads wesentlich größer ist als der elektrische Widerstand des Elektrolyten und die Dielektrizitätskonstante deutlich kleiner ist, ergibt sich bei erfolgreicher Hybridisierung eine Abnahme des kapazitiven Anteils der Impedanz.

30

Anschaulich ist eine solche Impedanzänderung nicht mit der Bündelung der Feldlinien zwischen den Beads wie im Falle metallisch leitfähiger Labels, sondern mit einer Verdrängung der Feldlinien aus dem durch die elektrisch schlecht leitenden Beads mit geringer Dielektrizitätskonstante  
35 eingenommenen Volumen verbunden.

Möglich ist auch, elektrisch schlecht leitfähige Beads oder Moleküle zu verwenden, die eine sehr große relative Dielektrizitätskonstante aufweisen. In diesem Falle erfolgt bei niedrigen Frequenzen eines anregenden Signals eine  
5 Impedanzzunahme, bei hohen Frequenzen eine Impedanzabnahme.

Ein Vorteil bei der Verwendung elektrisch schlecht leitender Beads besteht darin, dass eine Zunahme der Impedanz auf bestimmte Frequenzbereiche eines anregenden Signals begrenzt  
10 sein kann, da auch die dielektrischen Eigenschaften der betrachteten Beads eine Rolle spielen. Mittels Einstellens einer geeigneten Frequenz kann das Verhältnis der erwünschten kapazitiven Beiträge gegenüber den ohmschen Beiträgen optimal eingestellt werden.

15 Ein anderer Vorteil des erfindungsgemäßen Sensor-Elements ist, dass eine besonders geringe Strukturbreite der Elektroden nicht erforderlich ist, da der ausgenützte Effekt besonders beim Verwenden metallisch leitfähiger Label sehr  
20 stark ausgeprägt ist. Daher ist die Herstellung des erfindungsgemäßen Sensor-Elements mit Standardprozessen und ohne teure Spezialprozesse wie Elektronenstrahl-Lithographie möglich.

25 Die verwendete Kopplungschemie für das Immobilisieren von Fängermolekülen ist erfindungsgemäß vorzugsweise darauf ausgerichtet, nicht nur auf, sondern insbesondere auch zwischen den Elektroden eine möglichst gute bzw. dichte Immobilisierung der Fängermoleküle zu garantieren. Die  
30 Qualität der Immobilisierung auf den Elektroden ist von eher untergeordneter Bedeutung. Sofern der erfindungsgemäße Sensor auf Basis eines Silizium-Substrats (z.B. Wafer, Chip) gefertigt wird, kann die Chipoberfläche zwischen benachbarten Sensoren bzw. zwischen benachbarten Elektroden z.B. aus den  
35 Materialien Siliziumoxid und/oder Siliziumnitrid gebildet sein. Diese Materialien sind zum Ankoppeln von Fängermolekülen ausreichend gut geeignet, darüber hinaus sind

diese Materialien in ihrer chemischen Beschaffenheit leicht modifizierbar und optimierbar. Für die Elektroden-Materialien ist z.B. Gold oder Platin eine gute Wahl. Besonders vorteilhaft sind chemisch inerte Materialien (z.B.

5 Edelmetalle). Das Sensor-Element der Erfindung ist mittels eines robusten und kostengünstigen Herstellungsprozesses fertigbar.

10 Ferner ist es möglich, die Elektroden vergraben oder mittels einer Dielektrikum-Deckschicht bedeckt vorzusehen. Dadurch wird zwischen den Elektroden und oberhalb der Elektroden die gleiche Oberfläche erhalten. Folglich muss die verwendete Kopplungschemie für die Immobilisierung der Fängermoleküle  
15 nur an ein Material angepasst werden. Insbesondere besteht das gesamte biochemische System aus einer Komponente weniger, ist insofern unkomplizierter und erlaubt eine einfachere und robustere Auslegung.

20 Die Verwendung aktiver CMOS-Chips ist in diesem Falle daher erfindungsgemäß ohne großen Aufwand möglich, da kein CMOS-fremdes Metall in einen Prozess integriert werden muss, welches die gegebenen biologischen Anforderungen erfüllt (z.B. Gold).

25 Bei Realisierung der Elektroden als vergrabene Elektroden erreicht man ferner eine vollkommene galvanische Trennung von Elektrolytpotential und Elektrodenpotentialen. Dies ist von Vorteil, wenn ein Gesamtsystem aus Elektrolyt, potentialgebenden schaltungstechnischen Komponenten für den  
30 Elektrolyten, Sensoren, und Sensorsignale auswertenden Schaltungen realisiert wird. Jede einzelne von diesen Komponenten kann wahlweise On-Chip oder Off-Chip vorgesehen sein.

35 Bevorzugte Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Das Sensor-Element kann eine elektrische isolierende Schicht zwischen den Elektroden und den Fängermolekülen und/oder auf Bereichen des Substrats zwischen den Elektroden aufweisen. In diesem Fall sind die Elektroden von dem Elektrolyten

5 galvanisch getrennt, unerwünschte elektrochemische Umsätze an den Elektroden werden vermieden und die Elektroden sind vor einem chemisch möglicherweise aggressiven Elektrolyten geschützt.

10 Die Fängermoleküle können einerseits auf oder über den Elektroden und andererseits zwischen den Elektroden immobilisiert sein. Bei einem Immobilisieren des Zwischenraums zwischen den Elektroden auf dem Substrat ist eine starke Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz  
15 und eine hohe Nachweissensitivität erreichbar.

Das Sensor-Element kann als Biosensor-Element eingerichtet sein, insbesondere zum Erfassen von DNA-Molekülen, Proteinen, Oligonukleotiden, etc.

20

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Sensor-Element als monolithisch integriertes Sensor-Element eingerichtet. In diesem Falle können in dem Substrat (z.B. Silizium-Wafer oder Silizium-Chip) elektrische Komponenten zum Ansteuern bzw.

25 Auslesen des Sensor-Elements integriert sein. Somit kann das erfindungsgemäße Sensor-Element mit den Vorzügen der modernen Silizium-Mikroelektronik realisiert werden, was eine erhöhte Integrationsdichte und eine besonders hohe Nachweissensitivität (beispielsweise aufgrund des  
30 Digitalisierens und/oder Vorverstärkens des Messsignals On-Chip) ermöglicht.

Das Sensor-Element kann zwei Elektroden aufweisen, und die Erfass-Einrichtung kann zum Erfassen eines elektrischen  
35 Wechselstromsignals infolge eines zwischen den beiden Elektroden angelegten Wechselspannungssignals eingerichtet sein. Die beiden Elektroden können beispielsweise als

Interdigitalelektroden (siehe Fig.1) oder als nebeneinander oder ineinander angeordnete flächige Elektroden eingerichtet sein. Mittels der Erfass-Einrichtung kann ein elektrisches Wechselspannungssignal angelegt werden, und es kann ein  
5 infolge eines Hybridisierungsereignisses aufgrund der Anwesenheit der Label veränderter Sensorstrom erfasst werden, um die kapazitive Komponente der Impedanz zu ermitteln.

Das Sensor-Element kann zwei Paare von Elektroden aufweisen,  
10 und die Erfass-Einrichtung kann zum Erfassen eines Stromsignals an einem der Paare und zum Erfassen eines Spannungssignals an dem anderen der Paare eingerichtet sein. Somit kann das Sensor-Element als Vierpolsensor mit zwei Force- und zwei Sense-Elektroden realisiert sein (vgl. Fig.11  
15 bis Fig.12B).

Die Fängermoleküle können in einem derartigen Abstand voneinander angeordnet sein und/oder die Label können eine derartige Dimension aufweisen, dass bei  
20 Hybridisierungsereignissen der Bereich zwischen den Elektroden von einer durchgehenden Überbrückung durch die Label frei ist. Im Unterschied zu dem aus [11] bekannten Verfahren ist es somit erfindungsgemäß nicht erforderlich, dass eine durchgehende elektrisch leitfähige Verbindung  
25 zwischen den Elektroden mittels der Label realisiert ist. Auch mittels einer teilweisen Verdrängung des Elektrolyten aus dem Bereich zwischen den Elektroden aufgrund der Label der zu erfassenden Partikel ist eine ausreichend starke Änderung des kapazitiven Anteils der Impedanz erreichbar, um  
30 ein messtechnisch auswertbares Signal zu erhalten.

Die Label können aus einem elektrisch isolierenden Material gebildet sein. Insbesondere können die Label eine relative Dielektrizitätskonstante aufweisen, die größer ist als eine  
35 relative Dielektrizitätskonstante des Analyten.



Alternativ können die Label aus einem elektrisch leitfähigen Material gebildet sein. Insbesondere können die Label aus metallischen Kügelchen mit Dimensionen im Nanometerbereich gebildet sein.

5

Ferner ist möglich, einen Teil der Label aus einem elektrisch leitfähigen Material und einen anderen Teil der Label aus einem dielektrischen Material vorzusehen.

- 10 Ausgestaltungen des Sensor-Elements gelten auch für das Sensor-Array und für das Verfahren zum Erfassen von in einem Analyten möglicherweise enthaltenen Partikeln.

15 Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in den Figuren dargestellt und werden im Weiteren näher erläutert.

Es zeigen:

- 20 Figur 1 eine Draufsicht und eine Querschnittsansicht, aufgenommen entlang der in Figur 1 gezeigten Schnittlinie I-I', eines Biosensor-Elements gemäß dem Stand der Technik,

- 25 Figuren 2A, 2B Querschnittsansichten eines Teilbereichs des in Figur 1 gezeigten Biosensor-Elements in zwei unterschiedlichen Betriebszuständen,

- 30 Figur 3 einen Teilbereich des Biosensor-Elements aus Figur 1 mit einem symmetrischen Feldlinienverlauf,

- Figuren 4A, 4B erste und zweite Ersatzschaltbilder eines Teilbereichs des Biosensor-Elements aus Figur 1,

- 35 Figuren 5A bis 5D andere Ersatzschaltbilder eines Teilbereichs des Biosensor-Elements aus Figur 1,

Figuren 6A, 6B vergrößerte Darstellungen eines Teilbereichs  
des Biosensor-Elements aus Figur 1,

5 Figuren 7A, 7B schematische Ansichten von Biosensor-Elementen  
gemäß dem Stand der Technik mit unterschiedlichen  
Strukturdimensionen,

10 Figuren 8A, 8B ein Biosensor-Element gemäß einem ersten  
Ausführungsbeispiel der Erfindung in zwei  
unterschiedlichen Betriebszuständen,

15 Figur 9A, 9B schematische Ansichten des elektrischen  
Feldverlaufs des in Figur 8A, 8B gezeigten Biosensor-  
Elements gemäß dem ersten Ausführungsbeispiel der  
Erfindung in den beiden Betriebszuständen,

20 Figuren 10A, 10B ein Biosensor-Element gemäß einem zweiten  
Ausführungsbeispiel der Erfindung in zwei  
unterschiedlichen Betriebszuständen,

Figur 11 eine Ansicht eines Biosensor-Elements gemäß einem  
dritten Ausführungsbeispiel der Erfindung,

25 Figuren 12A, 12B unterschiedliche Ansichten eines Biosensor-  
Elements gemäß einem vierten Ausführungsbeispiel der  
Erfindung.

30 Gleiche oder ähnliche Komponenten in unterschiedlichen  
Figuren sind mit gleichen Bezugsziffern versehen.

Die Darstellungen in den Figuren sind schematisch und nicht  
maßstäblich.

35 Im Weiteren wird bezugnehmend auf **Fig.8A, Fig.8B** ein  
Biosensor-Element 800 gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel  
der Erfindung beschrieben.

Das Biosensor-Element 800 zum Erfassen von in einem Analyten  
möglicherweise enthaltenen DNA-Halbsträngen weist ein  
Silizium-Substrat 801 auf. Auf und in dem Silizium-Substrat  
801 sind eine erste Gold-Elektrode 802 und eine zweite Gold-  
5 Elektrode 803 gebildet. In dem Silizium-Substrat 801 ist eine  
Erfass-Einrichtung 804 monolithisch integriert. Mittels der  
Erfass-Einrichtung 804 ist zwischen die Elektroden 802, 803  
eine Wechselspannung anlegbar und ein resultierendes  
Wechselstromsignal erfassbar. Aus dem detektierten  
10 Wechselstromsignal kann mittels der Erfass-Einrichtung der  
Wert des kapazitiven Anteils der Impedanz bzw. die  
Veränderung eines solchen Wertes aufgrund eines  
Hybridisierungsereignisses erfasst werden. Ein solches  
Sensorsignal wird von der Erfass-Einrichtung 804 „On-Chip“ in  
15 dem Silizium-Substrat 801, d.h. ortsnahe zu dem  
Sensorereignis, vorverarbeitet und verstärkt und mittels  
einer vergrabenden Kommunikationsleitung 805 an eine  
bezüglich des Silizium-Substrats 801 externe Auswerteeinheit  
806 (Off-Chip realisiert) übermittelt.

20 Sowohl auf den Gold-Elektroden 802, 803 als auch auf dem  
Bereich des Silizium-Substrats 801 zwischen den Gold-  
Elektroden 802, 803 sind DNA-Halbstränge als Fängermoleküle  
807 immobilisiert.

25 Fig.8A zeigt das Biosensor-Element 800 in einem ersten  
Betriebszustand, bevor das Biosensor-Element 800 mit einem  
möglicherweise zu erfassende Partikeln enthaltenen Analyten  
in Kontakt gebracht ist.

30 Fig.8B zeigt das Biosensor-Element 800, nachdem es mit einem  
elektrolytischen Analyten 808 in Kontakt gebracht worden ist.  
Der Analyt 808 enthält zu den Fängermolekülen 807  
komplementäre DNA-Halbstränge als zu erfassende Partikel 809.  
35 An die zu erfassenden Partikel 809 sind elektrisch gut  
leitfähige Gold-Label 810 als Label mit im Vergleich zu dem  
Elektrolyten deutlich unterschiedlichen elektrischen

Eigenschaften gebunden. Bei dem in Fig.8B gezeigten Szenario sind die Basensequenzen der Fängermoleküle 807 und der zu erfassenden Partikel 809 zueinander komplementär, so dass es zu Hybridisierungsereignissen kommt („Match“). Falls die  
5 Basensequenzen von Fängermolekülen 807 und zu erfassenden Partikeln 809 zueinander nicht komplementär sind, erfolgt keine Hybridisierung („Mismatch“, nicht gezeigt). Nach erfolgter Hybridisierung sind, wie in Fig.8B gezeigt, die Umgebungsbereiche der Elektroden 802, 803 teilweise von den  
10 Gold-Labeln 810 eingenommen.

Es ist anzumerken, dass in Fig.8A, Fig.8B der Abstand benachbarter Fängermoleküle 807 voneinander typischerweise in der Größenordnung von 10 Nanometern liegt, die Ausdehnung der  
15 Gold-Label 810 liegt typischerweise im Bereich von 2 bis 7 Nanometern. Aufgrund der hybridisierungsbedingten elektrodennahen Anwesenheit der Gold-Label 810 mit von dem Analyten 808 unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften wird der kapazitive Anteil der Impedanz zwischen den  
20 Elektroden 802, 803 stark verändert.

Die Fängermoleküle 807 sind nicht nur auf den Elektroden 802, 803, sondern auch auf den Zwischenräumen zwischen den Elektroden 802, 803 immobilisiert. Die zu erfassenden  
25 Partikel 809 sind mit den Gold-Labeln 810 versehen und mit den Fängermolekülen 807 hybridisiert. Daher entsteht oberhalb der Elektroden 802, 803 und in den Zwischenräume zwischen den Elektroden 802, 803 ein Bereich, innerhalb welchen ein erheblicher Teil des Volumens mit den metallisch leitfähigen  
30 Gold-Labeln 810 ausgefüllt sind. Je nach Durchmesser der Gold-Label 810 und je nach der Dichte der immobilisierten und hybridisierten Moleküle 807, 809 kann in Teilbereichen 811 aufgrund einer Berührung benachbarter Gold-Label 810 auch eine elektrisch leitende Verbindung entstehen. Allerdings ist  
35 dies nicht Voraussetzung für die Detektierbarkeit eines Sensorereignisses, da nicht ein ohmscher Widerstand, sondern der kapazitive Anteil einer Impedanz erfasst wird. Mittels

Einbringens des elektrisch gut leitfähigen Materials der Gold-Label 810 wird der Verlauf der Feldlinien in einem Umgebungsbereich der Elektroden 802, 803 massiv beeinflusst, d.h. der Messeffekt ist groß und die Nachweissensitivität wird erheblich verbessert.

In **Fig.9A** ist schematisch der Verlauf der Feldlinien bei dem Sensor-Element 800 vor einem Hybridisierungsereignis gezeigt. In **Fig.9A** ist ein erster Verlauf elektrischer Feldlinien 901 zwischen Symmetrielinien 900 gezeigt.

Ferner ist in **Fig.9B** der Verlauf der Feldlinien bei dem Sensor-Element 800 nach erfolgtem Hybridisierungsereignis schematisch gezeigt. In **Fig.9B** ist ein Szenario gezeigt, nachdem ein die zu erfassende Partikel 809 erhaltener Analyt 808 mit dem Sensor-Element 800 in Wirkkontakt gebracht worden ist. Nach einer Hybridisierung zwischen den Fängermolekülen 807 und den zu erfassenden Partikeln 809 (nicht gezeigt in **Fig.9B**) sind mit den zu erfassenden Partikeln 809 gekoppelte Gold-Label 810 in einem Umgebungsbereich der Elektroden 802, 803 angeordnet, wodurch es zu einer erheblichen Verzerrung der elektrischen Feldlinien kommt, was in dem schematischen zweiten elektrischen Feldlinienverlauf 902 gezeigt ist. Da die Gold-Beads 810 Äquipotentialbereiche sind, stehen die Feldlinien 902 auf den Oberflächen der Gold-Label 810 orthogonal. Es kommt zu einer erheblichen Verdichtung der Feldlinien in einem Umgebungsbereich der Elektroden 802, 803, so dass der kapazitive Anteil der Impedanz zwischen den Elektroden 802, 803 aufgrund des Sensorereignisses erheblich verändert wird.

Im Weiteren wird bezugnehmend auf **Fig.10A**, **Fig.10B** ein Biosensor-Element gemäß einem zweiten Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben.

Das in **Fig.10A**, **Fig.10B** gezeigte Sensor-Element 1000 unterscheidet sich von dem in **Fig.8A** bis **Fig.9B** gezeigten

Sensor-Element 900 im Wesentlichen dadurch, dass anstelle von Gold-Labeln 810 die zu erfassenden Partikel 809 elektrisch isolierende Label 1002 aufweisen, und dass die Elektroden 802, 803 nicht an der Oberfläche des Biosensor-Elements 1000 angeordnet sind, sondern von dieser durch eine Siliziumnitrid-Passivierungsschicht 1001 getrennt sind. Auf der Passivierungsschicht 1001 in Bereichen oberhalb der Elektroden 802, 803 und zwischen den Elektroden 802, 803 sind wiederum Fängermoleküle 807 angeordnet. Bevor das Biosensor-Element 1000 mit einem möglicherweise zu erfassende Partikel enthaltenen Analyten in Kontakt gebracht wird, befindet sich das Biosensor-Element 1000 in dem Betriebszustand von Fig.10A.

Nachdem das Biosensor-Element 1000 mit einem zu erfassende Partikel 809 enthaltenen Analyten in Kontakt gebracht ist, kann infolge von komplementären Basensequenzen der Fängermoleküle 807 und der zu erfassenden Partikel 809 ein Hybridisierungsereignis stattfinden, wie in Fig.10B gezeigt. Abweichend von dem in Fig.8A bis Fig.9B gezeigten Biosensor-Element 800 sind bei dem Biosensor-Element 1000 an den zu erfassenden Partikeln 809 elektrisch isolierende Label 102 angebracht. Infolge eines Hybridisierungsereignisses wird somit ein Umgebungsbereich der Elektroden 802, 803 mit elektrisch isolierenden Labeln 1002 besetzt, welche Material des elektrisch leitfähigen elektrolytischen Analyten aus einem Umgebungsbereich der Elektroden 802, 803 verdrängen. Aufgrund der elektrisch isolierenden Eigenschaft der elektrisch isolierenden Label 1002 werden somit die elektrischen Eigenschaften in dem Bereich zwischen den Elektroden 802, 803 signifikant modifiziert, so dass sich der Wert eines Sensorstroms bei Anlegen eines elektrischen Wechselspannungssignals zwischen die Elektroden 802, 803 aufgrund einer veränderten kapazitiven Komponente der Impedanz zwischen den Elektroden 802, 803 signifikant ändert.

Im Weiteren wird beziehend auf **Fig.11** ein Biosensor-Element 1100 gemäß einem dritten Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben.

5 Bei dem Biosensor-Element 1100 in Fig.11 sind in einem Silizium-Substrat 801 eine erste Force-Elektrode 1101 und eine zweite Force-Elektrode 1102 integriert. Ferner sind eine erste Sense-Elektrode 1103 und eine zweite Sense-Elektrode 1104 in dem Silizium-Substrat 801 integriert. Mittels einer  
10 Spannungs-Erfasseinheit 1105 zwischen den ersten und zweiten Sense-Elektroden 1103, 1104 kann eine Spannung zwischen diesen beiden Sense-Elektroden 1103, 1104 erfasst werden. Zwischen den Force-Elektroden 1101, 1102 kann mittels einer Strom-Erfasseinheit 1106 ein Messstrom zwischen den Force-  
15 Elektroden 1101, 1102 erfasst werden. Mittels einer Ladungsträgerquelle 1107 können elektrische Ladungsträger eingespeist werden. Auf den Elektroden 1101 bis 1104 und auf den Bereichen des Silizium-Substrat 801 zwischen jeweils benachbarten Elektroden 1101 bis 1104 ist eine  
20 Siliziumnitrid-Passivierungsschicht 1001 vorgesehen. Auf der Siliziumnitrid-Passivierungsschicht 1001 sind Fängermoleküle 807 immobilisiert. Nach Zugabe eines zu erfassenden Partikel 809 enthaltenen Analyten zu dem Sensor-Element 1001 erfolgen, falls die Fängermoleküle 807 zu den zu erfassenden Partikeln  
25 809 komplementär sind, Hybridisierungsereignisse. An die zu erfassenden Partikeln 809 sind Gold-Label 810 angebracht. Aufgrund der Anwesenheit der elektrisch gut leitenden Gold-Label 810 in einem Umgebungsbereich der Elektroden 1101 bis 1104 werden die elektrischen Eigenschaften verändert und  
30 somit die Impedanz zwischen den Elektroden verändert.

In **Fig.12A** ist ein im Vergleich zu Fig.11 modifiziertes Biosensor-Element 1200 gemäß einem vierten Ausführungsbeispiel der Erfindung ohne Dielektrikum über den  
35 Elektroden 1101 bis 1104 gezeigt.

Ferner ist in Fig.12B ein Ersatzschaltbild 1210 mit den schaltungstechnischen Komponenten des Biosensor-Elements 1200 gezeigt. Wie Fig.12B zu entnehmen ist, können Kapazität und ohmscher Widerstand der ersten Force-Elektrode 1101 mittels einer Parallelschaltung aus einer ersten Force-Kapazität  $C_f$  1211 und einem ersten ohmschen Force-Widerstand  $R_f$  1212 modelliert werden. Kapazitäten und ohmscher Widerstand der zweiten Force-Elektrode 1102 werden mittels einer Parallelschaltung aus einer zweiten Force-Kapazität  $C_f$  1213 und einem zweiten ohmschen Force-Widerstand  $R_f$  1214 simuliert. Die Kapazitäten und der ohmsche Widerstand der ersten Sense-Elektrode 1103 wird mittels einer Parallelschaltung aus einer ersten Sense-Kapazität  $C_s$  1215 und einem ersten ohmschen Sense-Widerstand  $R_s$  1216 modelliert. Kapazität und ohmscher Widerstand der zweiten Sense-Elektrode 1104 werden mittels einer Parallelschaltung aus einer zweiten Sense-Kapazität  $C_s$  1217 und einem zweiten ohmschen Sense-Widerstand  $R_s$  1218 simuliert. Ferner modellieren eine erste Elektrolyt-Kapazität  $C_{E(f-s)}$  1219 und ein dazu parallel geschalteter erster ohmscher Elektrolyt-Widerstand  $R_{E(f-s)}$  1220 Kapazität und ohmschen Widerstand des Systems aus erster Force-Elektrode 1211, erster Sense-Elektrode 1103 und dem dazwischen befindlichen Elektrolyten. In analoger Weise modellieren die zweite Elektrolyt-Kapazität  $C_{E(s-s)}$  1221 und der dazu parallel geschaltete zweite ohmsche Elektrolyt-Widerstand  $R_{E(s-s)}$  1222 Kapazität und ohmschen Widerstand des Systems aus der ersten Sense-Elektrode 1103, der zweiten Sense-Elektrode 1104 und dem dazwischen befindlichen Elektrolyten. Kapazität und ohmscher Widerstand des Systems aus der zweiten Sense-Elektrode 1104 und der zweiten Force-Elektrode 1102 sowie das dazwischen befindlichen Analyten wird mittels der zueinander parallel geschalteten dritten Elektrolyt-Kapazität  $C_{E(s-f)}$  1223 und dem dritten ohmschen Elektrolyt-Widerstand  $R_{E(s-f)}$  1224 modelliert.

Der Zweck dieser aus Force-Elektroden 1101, 1102 und Sense-Elektroden 1103, 1104 gebildeten Struktur ist die



Charakterisierung der Eigenschaften der Elemente  $C_{E(s-s)}$  und  $R_{E(s-s)}$ . Hybridisierungsbedingte Änderungen der Elemente  $C_s$  und  $R_s$ , welche den Zugang zur Messquelle bilden, beeinflussen das Messergebnis bei hinreichend hochohmigen Eingängen der Messquelle nicht. Ferner spielen bei Ausnutzung des Vierpolprinzips aus Fig.11 bis Fig.12B hybridisierungsbedingte Änderungen der Elemente  $C_s$ ,  $R_f$ ,  $C_{E(f-s)}$ ,  $R_{E(f-s)}$ ,  $C_{E(s-f)}$  und  $R_{E(s-f)}$  keine Rolle, wenn der in die Struktur eingeprägte oder fließende Strom und der gemessene Spannungsabfall zwischen den Sense-Elektroden bekannt ist.

Es ist möglich, die erfindungsgemäßen Sensor-Elemente aus Fig.11 bis Fig.12B mit an zu erfassenden Partikeln gebundenen Labeln mit einem Vierpolverfahren mit oder ohne Dielektrikum 1101 über den Elektroden 1101 bis 1104 zu verwenden. Wie in Fig.11 bis Fig.12B gezeigt, sind die Fängermoleküle 807 auch in den Zwischenräumen zwischen den Elektroden 1101 bis 1104 immobilisiert. Da im Falle erfolgreicher Hybridisierung der Großteil der Feldlinien in das durch Hybridisierung und daher durch das Vorhandensein der Label 810 gekennzeichnete Volumen gezwungen wird, zielt das Vierpolverfahren in diesem Falle nicht auf die Charakterisierung von Eigenschaften, die räumlich eher mit dem Volumen des Elektrolyten assoziiert werden, sondern auf einen schmalen Bereich 1108 oberhalb der Oberfläche des Biosensor-Elements 1100 zwischen den Sense-Elektroden 1103, 1104 ab. Vorteilhaft an den Vierpolimpedanzverfahren gegenüber einem Zweipolimpedanzverfahren (vergleiche Fig.8A bis Fig.10B) ist, dass die Elektroden selbst kein Einfluss auf das Messergebnis haben, sondern im Wesentlichen nur die Impedanz zwischen den Elektroden (sensitiver Bereich 1108 in Fig.11A).

In diesem Dokument sind folgende Veröffentlichungen zitiert:

- [1] Paeschke, M et al. (1996) Electroanalysis, 7, Nr.1,  
Seiten 1 bis 8
- 5 [2] Hintzsche, R et al. (1997) „Microbiosensors using  
electrodes made in Si-technology“ In: Scheller, FW et  
al. (eds.) „Frontiers in Biosensorics I - Fundamental  
Aspects“, Birkhauser Verlag Basel
- 10 [3] WO 93/22678
- [4] DE 19610115 A1
- 15 [5] US Patent Serial Number 60/007840
- [6] van Gerwen, P et al. (1997), Transducers '97, Seiten 907  
bis 910
- 20 [7] Krause, C et al. (1996) Langmuir, Vol.12, Nr.25, Seiten  
6059 bis 6064
- [8] Mirsky, VM (1997) Biosensors&Bioelectronics, Vol.12,  
Nr.9-10, Seiten 977 bis 989
- 25 [9] Thewes, R et al. (2002) „Sensor Arrays for Fully  
Electronic DNA Detection on CMOS“, ISSCC Digest of  
Tech. Papers, Seiten 350f, 472f
- 30 [10] Hofmann, F et al. (2002) „Fully Electronic DNA Detection  
on a CMOS Chip: Device and Process Issues“, IEDM  
Tech. Digest, Seiten 488 bis 491
- [11] Xue, M et al. (2002) „A self-assembly conductive device  
35 for direct DNA identification in integrated  
microarray based system“ IEDM Tech. Digest, Seiten  
207 to 210

[12] 101 22 659 A1

## Bezugszeichenliste

- 100 Biosensor-Element
- 101 Substrat
- 102 erste Elektrode
- 103 zweite Elektrode
- 104 Teilbereich
- 200 Fängermoleküle
- 201 Analyt
- 202 Impedanz
- 203 zu erfassende Partikel
- 300 Umgebungsbereiche
- 301 elektrische Feldlinien
- 302 Symmetrielinien
- 400 erstes Ersatzschaltbild
- 401 zweite Elektrode-Elektrolyt-Kapazität
- 402 zweite Elektrode-Elektrolyt-Widerstand
- 403 Elektrolyt-Kapazität
- 404 Elektrolyt-Widerstand
- 405 erste Elektrode-Elektrolyt-Kapazität
- 406 erste Elektrode-Elektrolyt-Widerstand
- 410 zweites Ersatzschaltbild
- 500 Wechselspannungsquelle
- 501 Stromerfasseinheit
- 502 effektive Elektrode-Elektrolyt-Kapazität
- 503 effektiver Elektrode-Elektrolyt-Widerstand
- 504 Massepotential
- 800 Biosensor-Element
- 801 Silizium-Substrat
- 802 erste Gold-Elektrode
- 803 zweite Gold-Elektrode
- 804 Erfass-Einrichtung
- 805 vergrabene Kommunikationsleitung
- 806 externe Auswerteeinheit
- 807 Fängermoleküle

808 elektrolytischer Analyt  
809 zu erfassende Partikel  
810 Gold-Label  
811 Berührungsbereich  
900 Symmetrielinien  
901 erster elektrischer Feldlinienverlauf  
902 zweiter elektrischer Feldlinienverlauf  
1000 Biosensor-Element  
1001 Siliziumnitrid-Passivierungsschicht  
1002 elektrisch isolierende Label  
1100 Biosensor-Element  
1101 erste Force-Elektrode  
1102 zweite Force-Elektrode  
1103 erste Sense-Elektrode  
1104 zweite Sense-Elektrode  
1105 Spannungs-Erfasseinheit  
1106 Strom-Erfasseinheit  
1107 Ladungsträgerquelle  
1108 sensitiver Bereich  
1200 Biosensor-Element  
1210 Ersatzschaltbild  
1211 erste Force-Kapazität  
1212 erster ohmscher Force-Widerstand  
1213 zweite Force-Kapazität  
1214 zweiter ohmscher Force-Widerstand  
1215 erste Sense-Kapazität  
1216 erster ohmscher Sense-Widerstand  
1217 zweite Sense-Kapazität  
1218 zweiter ohmscher Sense-Widerstand  
1219 erste Elektrolyt-Kapazität  
1220 erster ohmscher Elektrolyt-Widerstand  
1221 zweite Elektrolyt-Kapazität  
1222 zweiter ohmscher Elektrolyt-Widerstand  
1223 dritte Elektrolyt-Kapazität  
1224 dritter ohmscher Elektrolyt-Widerstand

**Patentansprüche:**

1. Sensor-Element zum Erfassen von in einem Analyten  
möglicherweise enthaltenen Partikeln,

- 5 • mit einem Substrat;
- mit mindestens zwei Elektroden in und/oder auf dem Substrat;
- mit an einem Oberflächenbereich des Substrats immobilisierten Fängermolekülen, die derart eingerichtet  
10 sind, dass sie mit in einem Analyten möglicherweise enthaltenen zu erfassenden Partikeln hybridisieren, welche Partikel ein Label aufweisen, das von dem Analyten unterschiedliche elektrische Eigenschaften aufweist;
- 15 • mit einer mit den Elektroden gekoppelten Erfass-Einrichtung zum Erfassen einer Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz zwischen den Elektroden aufgrund infolge eines Hybridisierungsereignisses in einem Umgebungsbereich der Elektroden befindlicher  
20 Label.

2. Sensor-Element nach Anspruch 1,  
mit einer elektrisch isolierenden Schicht zwischen den Elektroden und den Fängermolekülen und/oder auf Bereichen des  
25 Substrats zwischen den Elektroden.

3. Sensor-Element nach Anspruch 1 oder 2,  
bei dem die Fängermoleküle einerseits auf oder über den Elektroden und andererseits zwischen den Elektroden  
30 immobilisiert sind.

4. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
eingerichtet als Biosensor-Element.

35 5. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
eingerichtet als monolithisch integriertes Sensor-Element.

6. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
das zwei Elektroden aufweist, und bei dem die Erfass-  
Einrichtung zum Erfassen eines Wechselstromsignals infolge  
eines zwischen zwei Elektroden angelegten  
5 Wechselspannungssignals eingerichtet ist.
7. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
das zwei Paare von Elektroden aufweist, und bei dem die  
Erfass-Einrichtung zum Erfassen eines Stromsignals an einem  
10 der Paare und zum Erfassen eines Spannungssignals an dem  
anderen der Paare eingerichtet ist.
8. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
bei dem die Fängermoleküle in einem derartigen Abstand  
15 voneinander angeordnet sind und/oder bei dem die Label eine  
derartige Dimension aufweisen, dass bei  
Hybridisierungsereignissen der Bereich zwischen den  
Elektroden von einer durchgehenden Überbrückung durch die  
Label frei ist.  
20
9. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
bei dem die Label aus einem elektrisch isolierenden Material  
gebildet sind.
- 25 10. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
bei dem die Label eine relative Dielektrizitätskonstante  
aufweisen, die größer ist als eine relative  
Dielektrizitätskonstante des Analyten.
- 30 11. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
bei dem die Label eine relative Dielektrizitätskonstante  
aufweisen, die kleiner ist als eine relative  
Dielektrizitätskonstante des Analyten.
- 35 12. Sensor-Element nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
bei dem die Label aus einem elektrisch leitfähigen Material  
gebildet sind.

13. Sensor-Element nach Anspruch 12,  
bei dem die Label aus metallischen Kügelchen mit Dimensionen  
im Nanometer-Bereich gebildet sind.

5

14. Sensor-Array  
mit einer Mehrzahl von in und/oder auf dem Substrat  
gebildeten Sensor-Elementen nach einem der Ansprüche 1 bis  
13.

10

15. Verfahren zum Erfassen von in einem Analyten  
möglicherweise enthaltenen Partikeln,

- mit einem Sensor-Element
  - o mit einem Substrat;
  - 15 o mit mindestens zwei Elektroden in und/oder auf dem Substrat;
  - o mit an einem Oberflächenbereich des Substrats immobilisierten Fängermolekülen, die derart eingerichtet sind, dass sie mit in einem Analyten
  - 20 möglicherweise enthaltenen zu erfassenden Partikeln hybridisieren, welche Partikel ein Label aufweisen, das von dem Analyten unterschiedliche elektrische Eigenschaften aufweist;
  - o mit einer mit den Elektroden gekoppelten Erfass-
  - 25 Einrichtung zum Erfassen einer Veränderung des kapazitiven Anteils der Impedanz zwischen den Elektroden aufgrund infolge eines Hybridisierungsereignisses in einem Umgebungsbereich der Elektroden befindlicher Label;
- 30 • wobei gemäß dem Verfahren
  - o der Analyt mit den an dem Oberflächenbereich des Substrats immobilisierten Fängermolekülen in Wirkkontakt gebracht wird derart, dass die Fängermoleküle mit in dem Analyten möglicherweise
  - 35 enthaltenen zu erfassenden Partikeln hybridisieren, welche Partikel ein Label aufweisen, das von dem Analyten unterschiedliche elektrische Eigenschaften

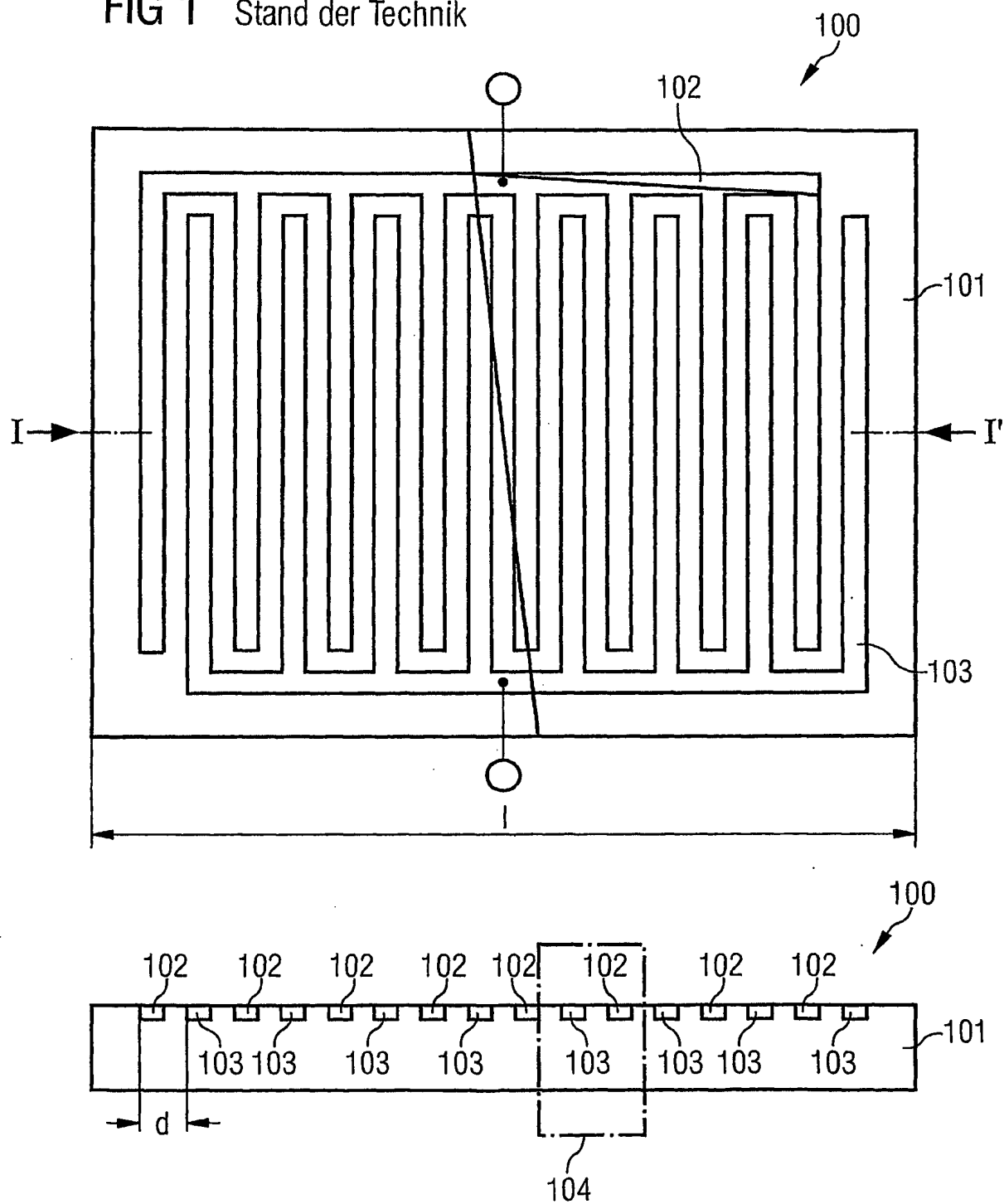


aufweist;

- o mittels der mit den Elektroden gekoppelten Erfass-  
Einrichtung eine Veränderung des kapazitiven  
Anteils der Impedanz zwischen den Elektroden  
aufgrund infolge eines Hybridisierungsereignisses  
in einem Umgebungsbereich der Elektroden  
befindlicher Label erfasst wird.

1/11

FIG 1 Stand der Technik



2/11

FIG 2A Stand der Technik

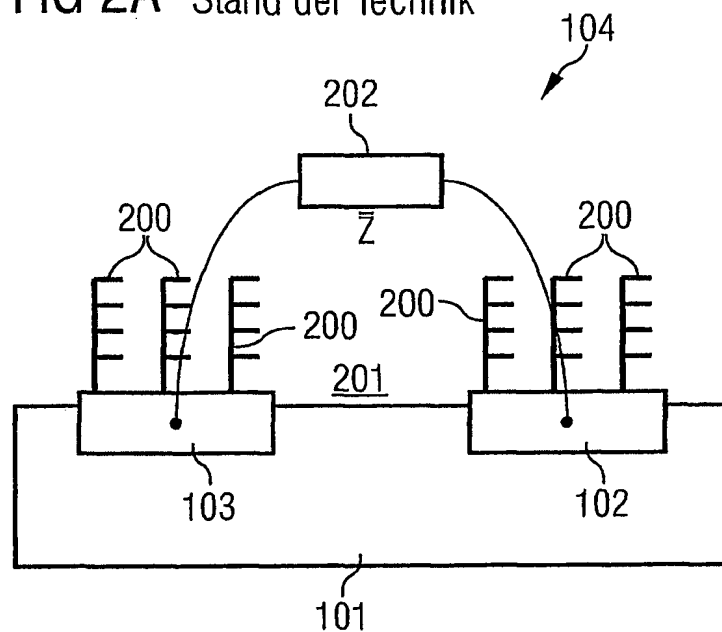


FIG 2B Stand der Technik

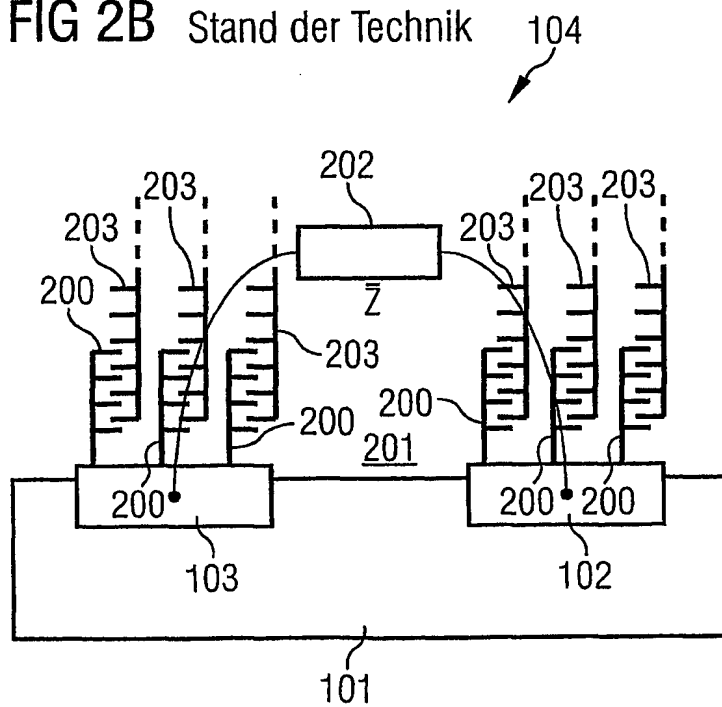
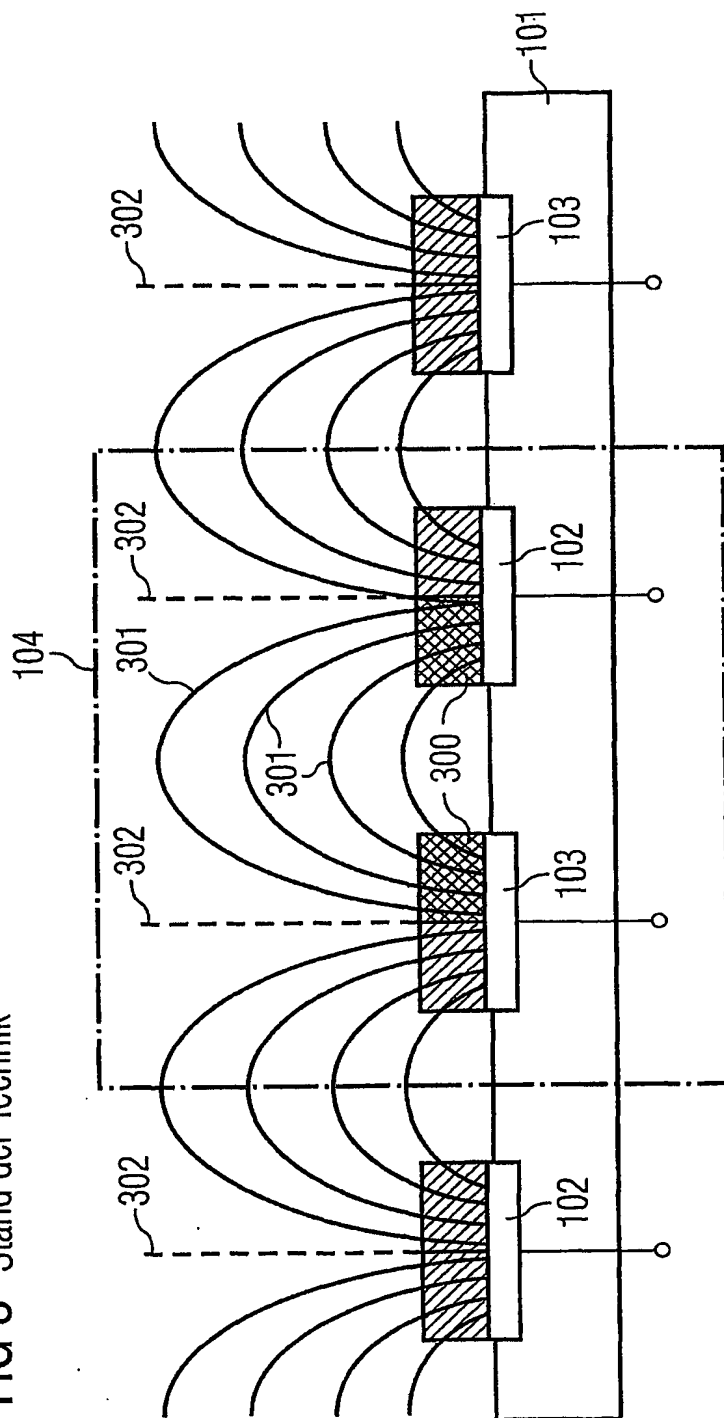


FIG 3 Stand der Technik



4/11

FIG 4A Stand der Technik

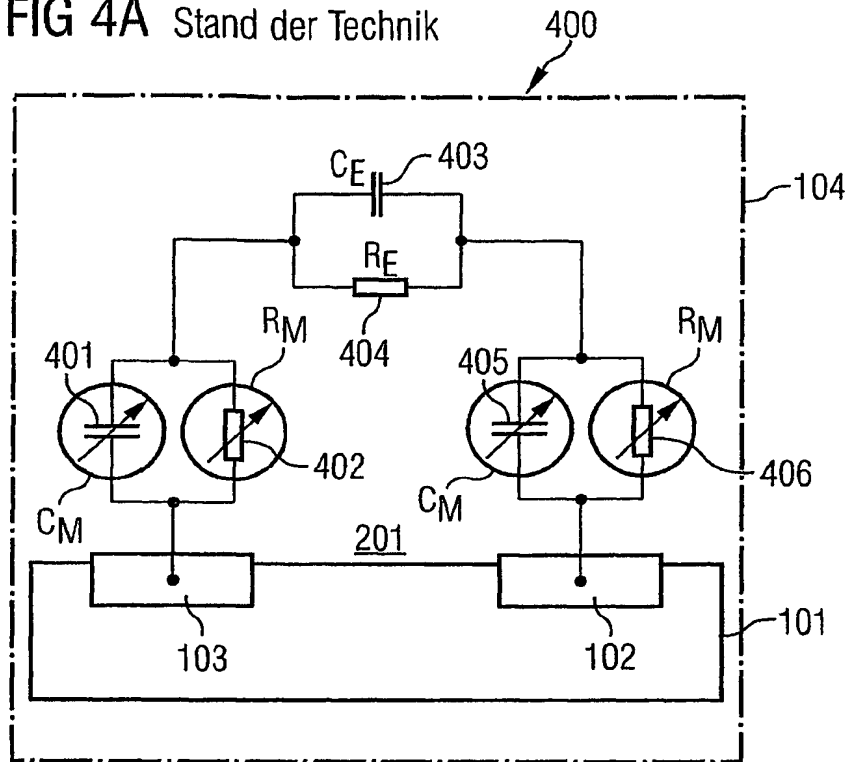
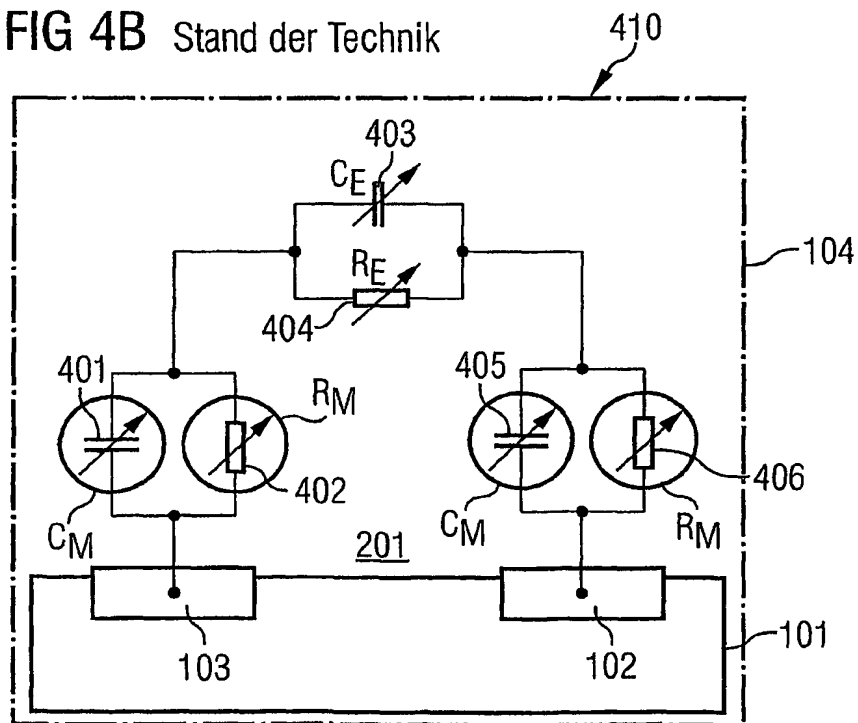


FIG 4B Stand der Technik



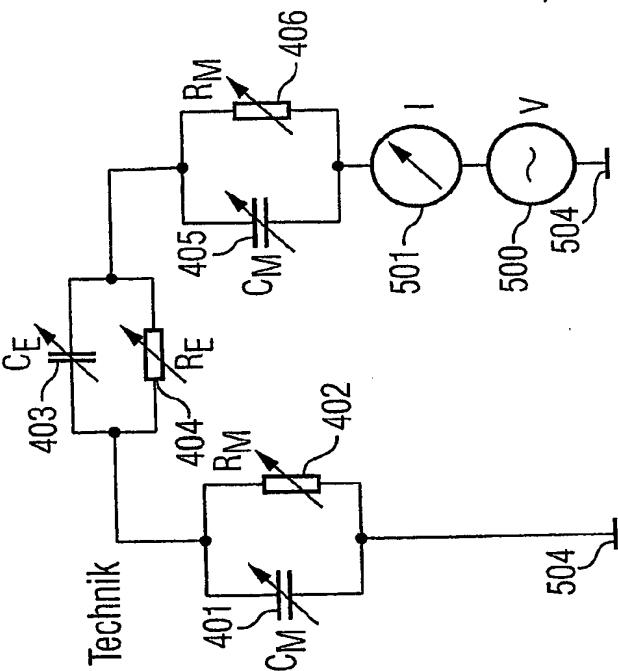


FIG 5C

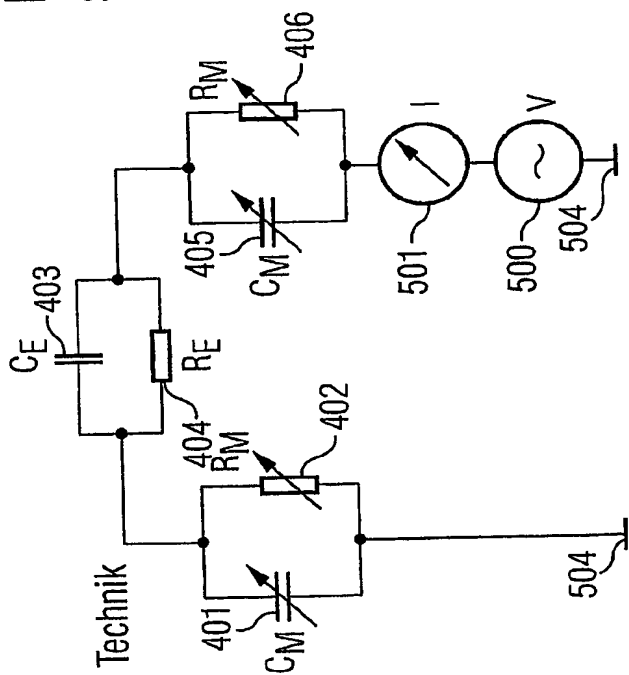


FIG 5A

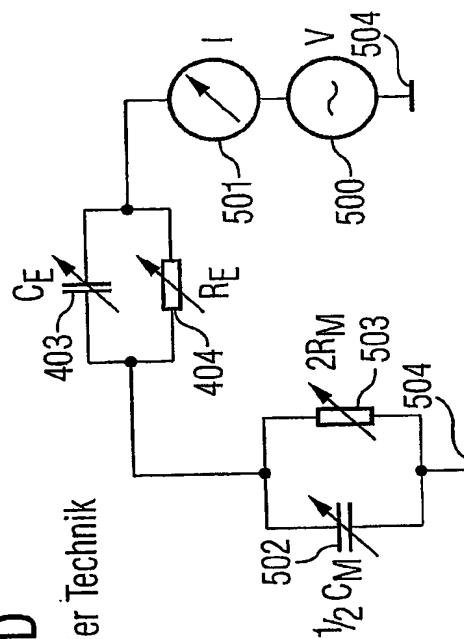


FIG 5D

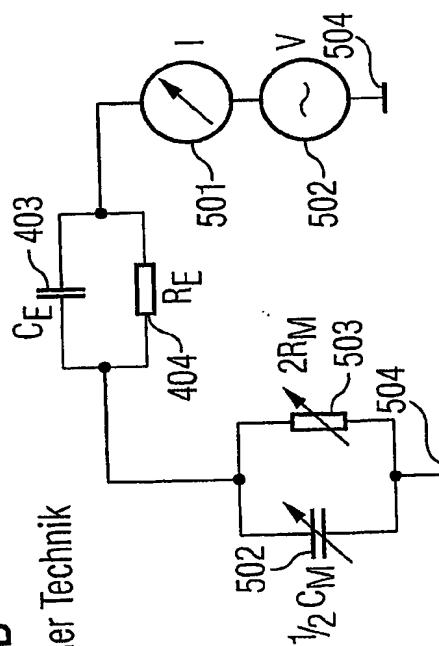


FIG 5B

FIG 6B Stand der Technik

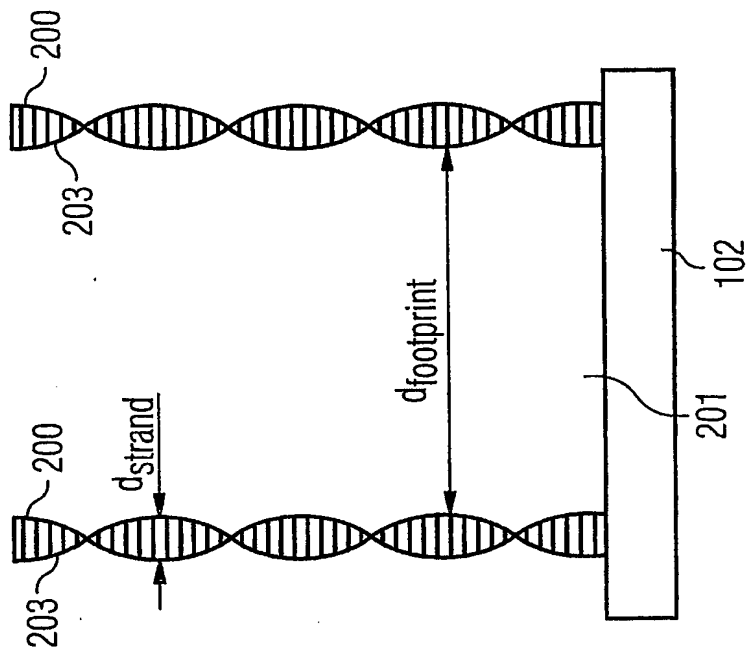


FIG 6A Stand der Technik

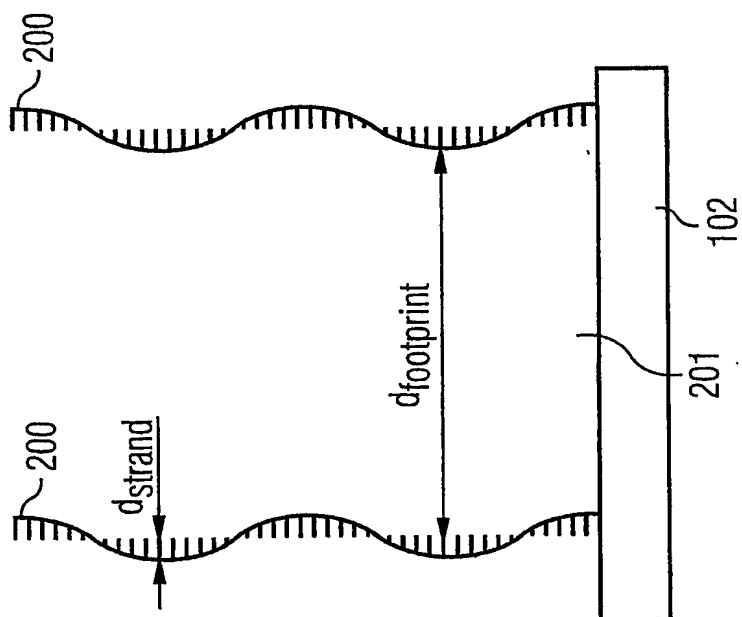


FIG 7A Stand der Technik

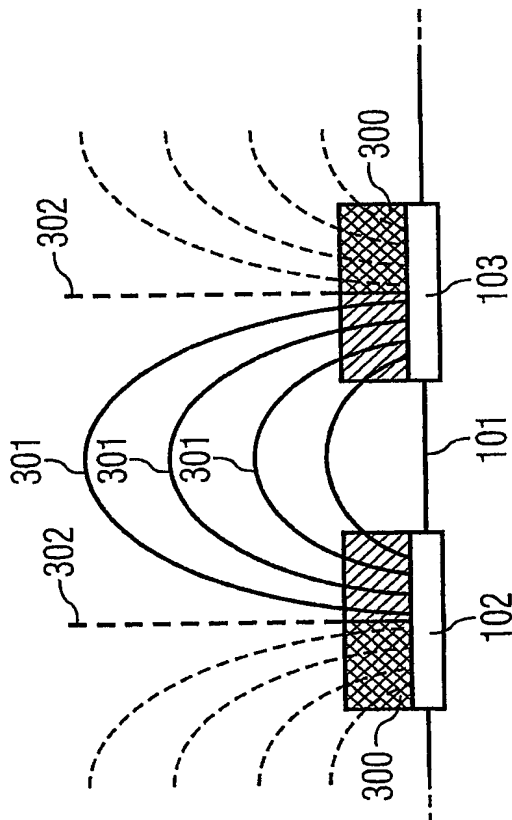
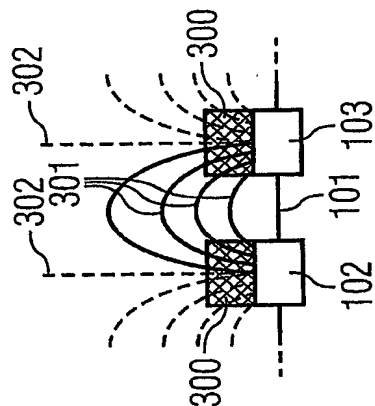


FIG 7B Stand der Technik







9/11

FIG 9A

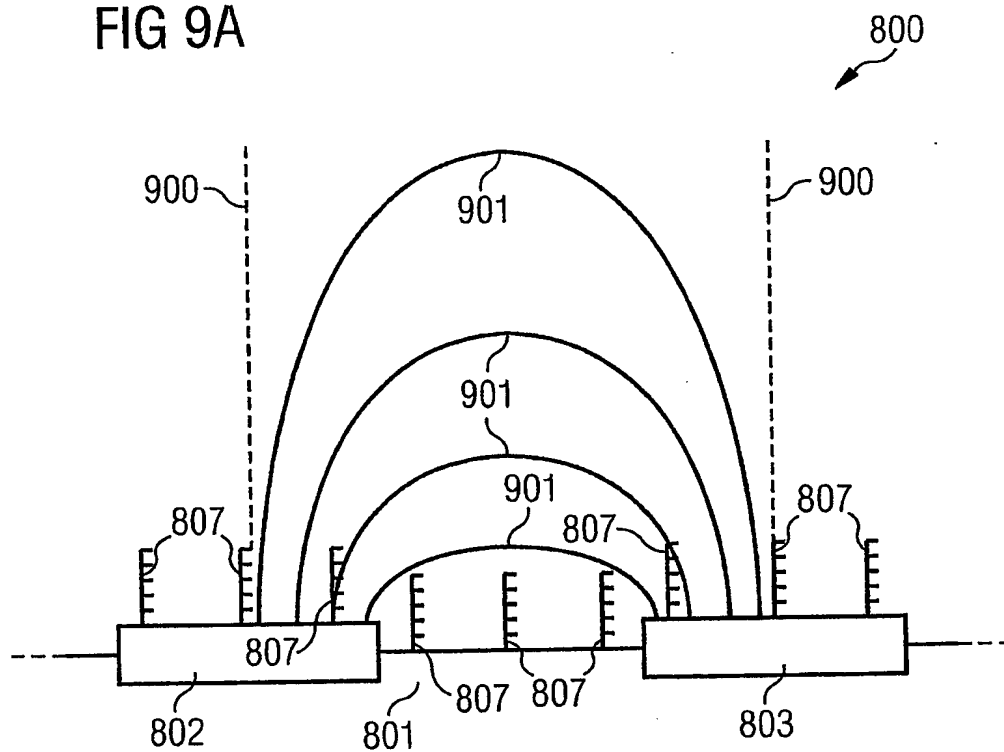
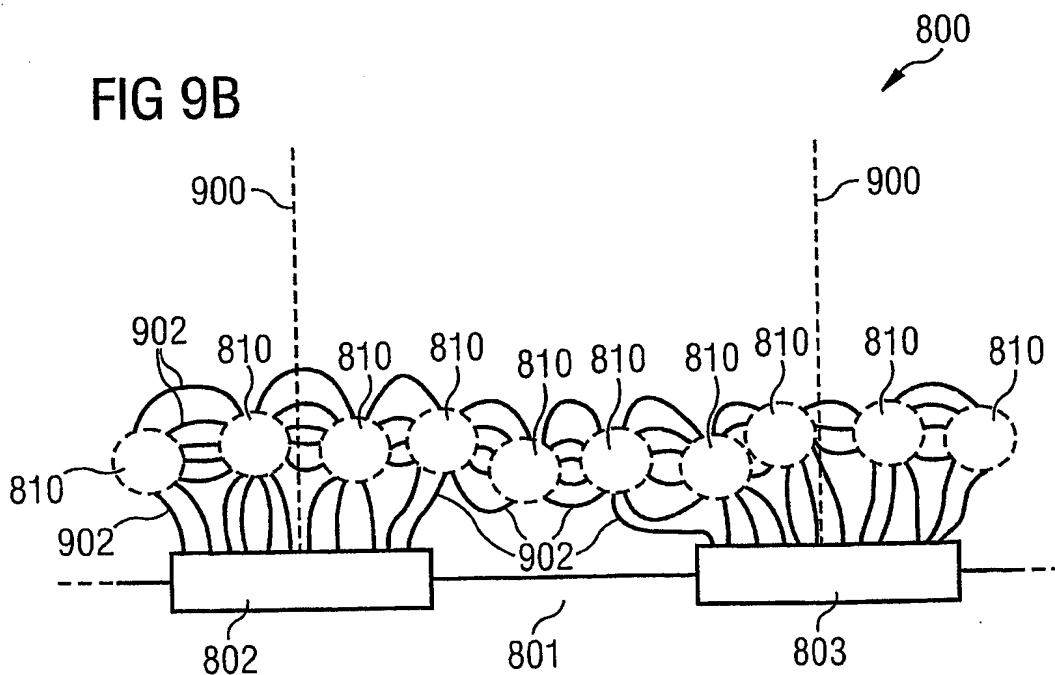


FIG 9B



10/11

FIG 10A

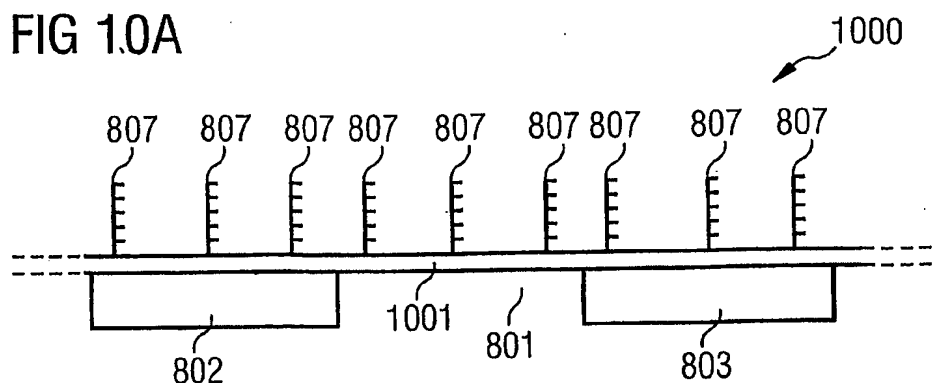


FIG 10B

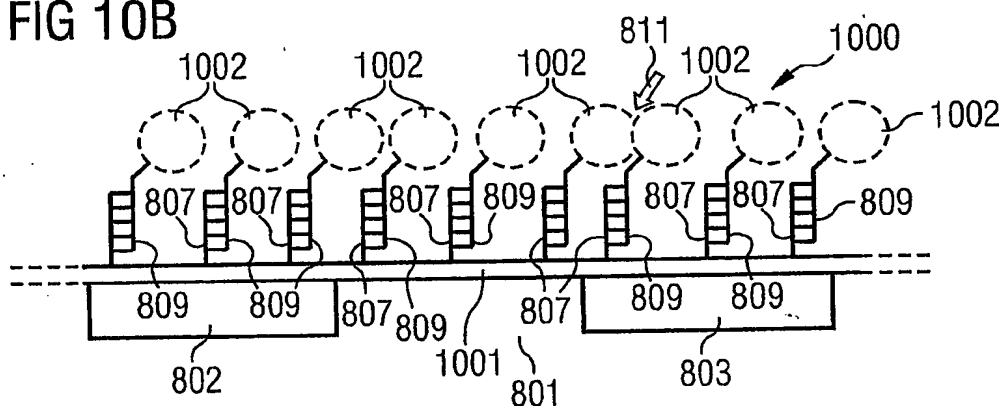
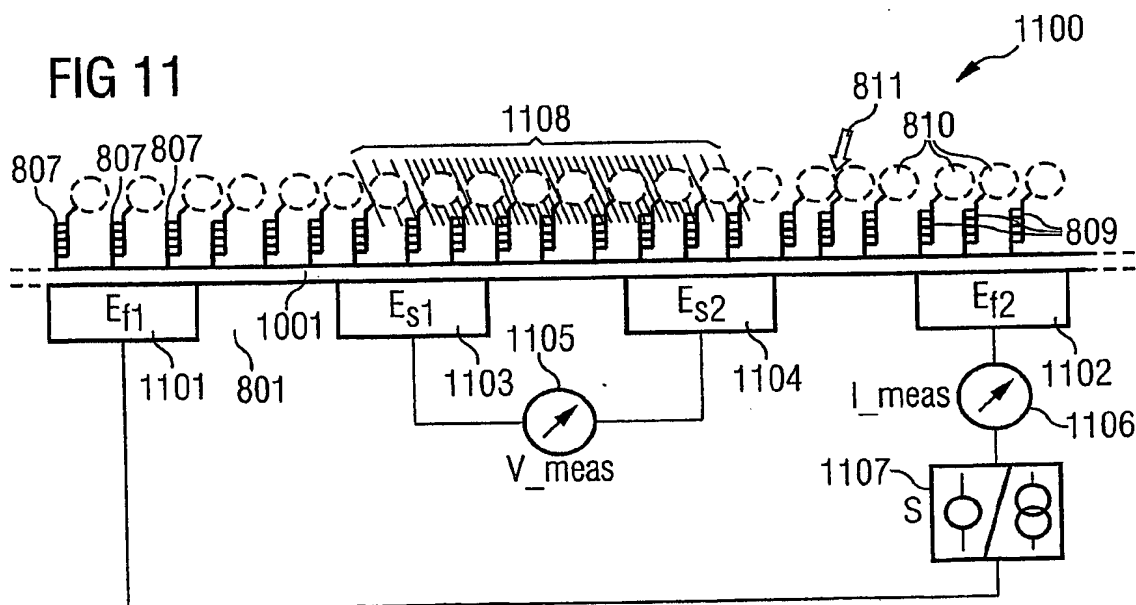


FIG 11



11/11

FIG 12A

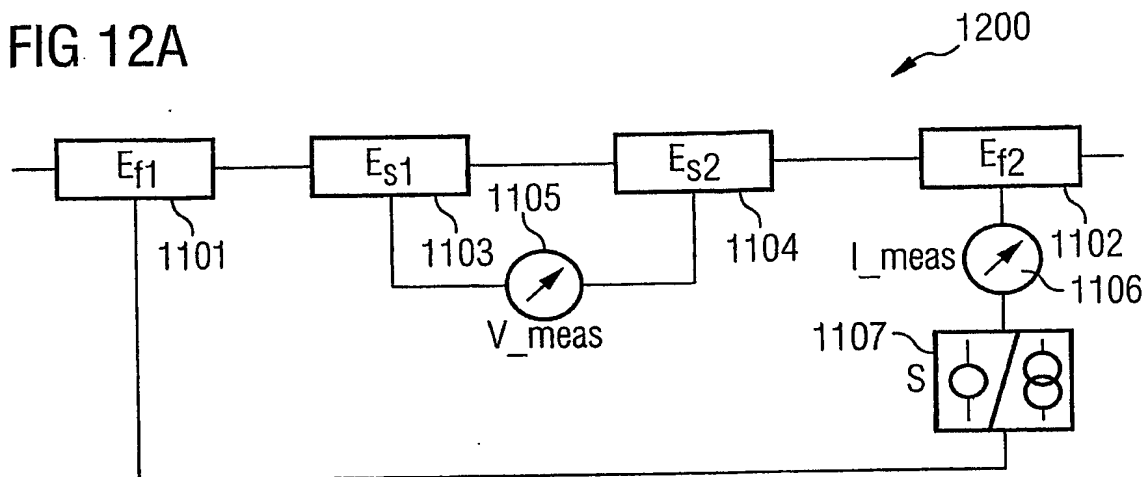
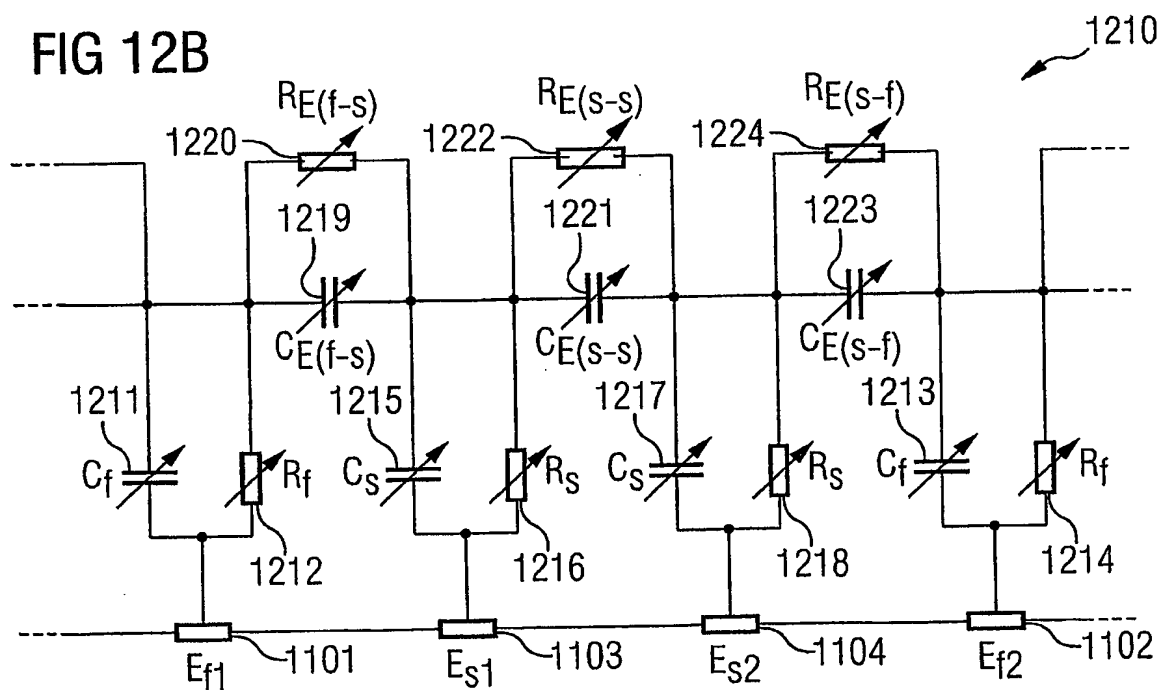


FIG 12B



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/000978

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/58 C12Q1/68 G01N27/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 922 537 A (BOGLE GAVIN T ET AL) 13 July 1999 (1999-07-13) column 3, line 66 - column 5, line 5; figure 2; table 8 column 8, line 62 - column 9, line 2; table 8 column 11, lines 50-65 column 14, lines 20-66; figures 3,4	1-15
X	US 6 440 662 B1 (ROSSAU RUDI ET AL) 27 August 2002 (2002-08-27) column 10, lines 13-52; figures 2,6A,6B	1-14
A	US 4 794 089 A (MROCZKOWSKI SUSAN J ET AL) 27 December 1988 (1988-12-27) column 4, line 41 - column 5, line 16; figure 3	1-15
----- -/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 2004

Date of mailing of the international search report

31/08/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wilhelm, J

# BEST AVAILABLE COPY

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000978

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5922537	A	13-07-1999	AU 4859797 A	03-06-1998
			WO 9821587 A1	22-05-1998
US 6440662	B1	27-08-2002	AT 271219 T	15-07-2004
			AU 719454 B2	11-05-2000
			AU 1066997 A	27-06-1997
			DE 69632921 D1	19-08-2004
			EP 0876601 A1	11-11-1998
			JP 2000501503 T	08-02-2000
			CA 2238003 A1	12-06-1997
			WO 9721094 A1	12-06-1997
US 4794089	A	27-12-1988	CA 1256495 A1	27-06-1989
			EP 0241771 A2	21-10-1987
			JP 2551575 B2	06-11-1996
			JP 63011861 A	19-01-1988
			US 5137827 A	11-08-1992
			US 5284748 A	08-02-1994
WO 0025136	A	04-05-2000	IL 126776 A	30-04-2001
			AU 759205 B2	10-04-2003
			AU 6485999 A	15-05-2000
			CA 2348415 A1	04-05-2000
			CN 1331800 T	16-01-2002
			EP 1125128 A1	22-08-2001
			WO 0025136 A1	04-05-2000
			JP 2002528098 T	03-09-2002
			US 2004033626 A1	19-02-2004

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000978

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 G01N33/58 C12Q1/68 G01N27/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 922 537 A (BOGLE GAVIN T ET AL) 13. Juli 1999 (1999-07-13) Spalte 3, Zeile 66 - Spalte 5, Zeile 5; Abbildung 2; Tabelle 8 Spalte 8, Zeile 62 - Spalte 9, Zeile 2; Tabelle 8 Spalte 11, Zeilen 50-65 Spalte 14, Zeilen 20-66; Abbildungen 3,4	1-15
X	US 6 440 662 B1 (ROSSAU RUDI ET AL) 27. August 2002 (2002-08-27) Spalte 10, Zeilen 13-52; Abbildungen 2,6A,6B	1-14
A	US 4 794 089 A (MROCZKOWSKI SUSAN J ET AL) 27. Dezember 1988 (1988-12-27) Spalte 4, Zeile 41 - Spalte 5, Zeile 16; Abbildung 3	1-15
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. August 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

31/08/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wilhelm, J

## INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000978

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5922537	A	13-07-1999	AU 4859797 A	03-06-1998
			WO 9821587 A1	22-05-1998
US 6440662	B1	27-08-2002	AT 271219 T	15-07-2004
			AU 719454 B2	11-05-2000
			AU 1066997 A	27-06-1997
			DE 69632921 D1	19-08-2004
			EP 0876601 A1	11-11-1998
			JP 2000501503 T	08-02-2000
			CA 2238003 A1	12-06-1997
			WO 9721094 A1	12-06-1997
US 4794089	A	27-12-1988	CA 1256495 A1	27-06-1989
			EP 0241771 A2	21-10-1987
			JP 2551575 B2	06-11-1996
			JP 63011861 A	19-01-1988
			US 5137827 A	11-08-1992
			US 5284748 A	08-02-1994
WO 0025136	A	04-05-2000	IL 126776 A	30-04-2001
			AU 759205 B2	10-04-2003
			AU 6485999 A	15-05-2000
			CA 2348415 A1	04-05-2000
			CN 1331800 T	16-01-2002
			EP 1125128 A1	22-08-2001
			WO 0025136 A1	04-05-2000
			JP 2002528098 T	03-09-2002
			US 2004033626 A1	19-02-2004